

ステロイド投与家兎における大腿骨内血管系の変化 —特に類洞から中心静脈に着目して—

金沢大学医学部医学科整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

堀 井 健 志

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序は未だ不明であるが、近年、静脈系の障害によるうっ血が関与している可能性が指摘されている。本研究では、ステロイド投与が骨内の静脈系に与える影響を知る目的で、家兎を対照群のA群、酢酸メチルブレドニゾロンを4週間投与したB群、8週間投与したC群に分け、ステロイド投与に伴う大腿骨内血管系の変化を、特に類洞 (sinusoid) から中心静脈に着目して観察した。微小血管造影では、A群において網目状構造を呈する類洞が認められたのに対し、B群では類洞の拡張および網目状構造の不明瞭化が認められた。C群ではこのような変化がさらに著明になっていたが、動脈性の阻血を示唆するような明らかな無血管領域はみられなかった。血管鑄型法を用いた走査型電子顕微鏡 (走査電顕) による観察では、C群における類洞の膨隆状の変化と網目状構造の不明瞭化が三次元的に明らかとなり、B群では、C群に至る前段階のような変化が認められた。しかし、直径20~70 μ m程度の細動脈には変化がみられなかった。凍結断面法を用いた走査電顕による観察では、C群の類洞は明らかに拡張しており、微小血管造影法および血管鑄型法で得られた所見が裏付けられた。また、類洞が周囲の脂肪細胞によって圧迫されているような所見はみられなかった。類洞の断面積測定では、A群が平均 $1.81 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ 、C群が平均 $5.70 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ で、C群において有意に断面積が増加していた。さらに、逆行性静脈造影では、C群の中心静脈は狭小化しており、還流障害が生じていることを示唆する変化が認められた。以上の成績から、ステロイド投与が骨内循環に引き起こす変化は、動脈系障害に基づく阻血ではなく、類洞から中心静脈にかけての静脈系障害によるうっ血であり、内圧の上昇した類洞には拡張ないしは膨隆状の変化が生じていることが明らかとなった。また、このうっ血状態はステロイド投与4週で既に生じていることも確認された。このことが骨内圧の上昇および血流量の低下をもたらして、大腿骨頭壊死発生の重要な因子になっていると考えた。

Key words steroid, osteonecrosis, sinusoid, vein

大腿骨頭壊死症は、股関節機能を著しく障害し歩行能力に重大な影響を及ぼす疾患である。ステロイド投与に伴う大腿骨頭壊死症は、1957年に初めて報告¹⁾されているが、その後のステロイド療法の普及と使用量の増大に伴って増加傾向にあり²⁾、現在では、ステロイドは重要な発生因子として広く認識されている。極めて多くの疾患に対するステロイドの有効性を鑑みると、今後もその使用量はさらに増大していくものと見込まれる。すなわち、ステロイド性大腿骨頭壊死症の増加は必至の情勢である。

しかし、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序については、最終的に骨頭の虚血によって発生するという点では意見が一致しているものの、虚血に至る機序は未だ解明されていない。これまで、骨頭壊死発生に関連するステロイドの作用として、骨頭内外の動脈系の血管障害説³⁾⁻⁵⁾、骨頭血管の脂肪塞栓説⁶⁾⁻⁸⁾、脂肪細胞の増大によるコンパートメント説¹⁰⁾⁻¹¹⁾などが提唱されてきたが、いずれも明確な証明はなされていないのが現状である。

これらの説に対して松本ら¹²⁾⁻¹⁴⁾は、ステロイド投与によって大腿骨頭血流量が低下する一方で骨内圧の上昇を認めることを実験的ならびに臨床的に証明し、骨頭壊死発生の前段階では、動脈系障害に先行して静脈系障害が生じて大腿骨内にうっ血が起こり、これが壊死発生の重要な環境因子になっていると報告した。その後、居石ら¹⁵⁾⁻¹⁷⁾は、ステロイド投与歴のある無症候性大腿骨頭壊死症例の剖検において、骨頭内外の動脈系には特に変化を認めなかったが、骨頭周囲静脈に高度の内腔狭窄が生じていたと報告し、西村¹⁸⁾は、ステロイド投与家兎に対する免疫組織学的研究において、全身の静脈に病変が認められたと報告した。すなわち、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序として、静脈系障害とそれに伴ううっ血が重要な役割を演じていると考えられるようになってきた。しかしながら、ステロイド投与によって、骨壊死発生の舞台となる骨内については、その静脈系にどのような変化が生じているのかを実験的に明らかにした報告はない。そこで本研究では、家兎にステロイドを投与し、それに伴う大腿骨内血管系の変化を、特に類洞 (sinusoid)

平成10年1月21日受付, 平成10年2月20日受理

Abbreviations: 走査電顕, 走査型電子顕微鏡

から中心静脈に着目して観察した。

対象および方法

I. 実験動物

実験動物には体重約3.5kgの成熟雌性日本白色家兔を用いた。対照群として、ステロイドの投与をせず同一条件で飼育した群をA群とした。ステロイド投与群としては、体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロン（日本アップジョン、東京）を週1回筋注し、4週間投与したB群、8週間投与したC群を作成した。ステロイドの筋注は、大腿骨周囲の血管損傷を避けるため背筋内に行い、右大腿骨を検討に用いた。

II. 実験項目

1. 微小血管造影

A群、B群、C群それぞれ5羽の家兔を使用した。造影剤には、粒子の径が1~2 μ m以下と非常に微細でかつ均一であり¹⁹⁾、極めて微小なレベルまで充溢可能なマイクロフィル（Flow Tek, Inc., Colorado, USA）を使用し、これに専用の希釈液を同量加えて、注入直前に硬化剤を少量添加したものをを用いた。

ネンプタール（大日本製薬、大阪）による静脈麻酔下に家兔を仰臥位とし、開腹の上、腹部大動脈を露出した。ここから19G静脈留置針を末梢方向に向けて刺入し、下大静脈を開放して、約38℃に加温したヘパリン加乳酸リンゲル液（乳酸リンゲル液100mlに対してヘパリン1000単位）を用いて十分に灌流した。開放した下大静脈から血液成分が流出しなくなったことを確認し、直ちに造影剤を手圧にて注入した。下大静脈から造影剤が十分に流出した後、この部位をクランプしてさらに数mlの注入を行い、注入を終了した。約10時間常温で放置して造影剤を硬化させた後に大腿骨を摘出し、大腿骨に付着する筋肉などの軟部組織および骨膜を完全に除去した。この大腿骨を10%ホルマリンに浸漬して固定し、ブランクリユクロ液で脱灰の後、軟X線撮影を行い、さらにSpalteholz法を用いて透明標本とした。Spalteholz法は吉田²⁰⁾の方法に準じ、50%から100%の希釈系列のアルコールで脱水した後、ベンゼンに2日、次いでベンゼンと安息香酸ベンジルを同量ずつ混合した溶液に2日以上浸し、骨組織の透明化が起こった状態で、実体顕微鏡SMZ-10（ニコン、東京）にて観察した。

2. 血管鑄型法を用いた走査型電子顕微鏡（走査電顕）による観察

A群、B群、C群それぞれ10羽の家兔を使用した。血管鑄型の作成は、Murakami²¹⁾の方法に準じたOhtaniら²²⁾の方法を用いて下記のように行った。鑄型剤には毛細血管注型用のレジン樹脂であるメルコックス CL-2R（大日本インキ工業、東京）を使用し、粘度を下げて注入を容易にするためにメタクリル酸メチルモノマー（和光純薬工業、大阪）を30%の割合で混合して、注入直前に硬化剤を少量添加したものをを用いた。

微小血管造影法と同様の麻酔および灌流を行った後、直ちに鑄型剤を手圧にて注入し、下大静脈から鑄型剤が十分に流出した後、この部位をクランプしてさらに数mlの注入を行い、注入を終了した。約1時間常温で放置して鑄型剤を硬化させた後に大腿骨を摘出し、さらに60度の温水に約12時間浸して完全に鑄型剤を硬化させた。この大腿骨を、マイクロ・カッティング・マシンBS3000-N（Exakt, Hamburg, Germany）を用いて約1cmの大きさに切断し、10%水酸化カリウム水溶液に約24時間浸して骨髓組織を溶解させた。これを蒸留水に浸して約2日間震盪す

ることによって洗浄し、蒸留水中で凍結させた後に骨軸方向に切断して、骨内の血管鑄型を露出させた。この血管鑄型を空気乾燥した後、試料台に載せ、ION COATER IB-3（Eiko engineering, 茨城）を用いて金蒸着し、走査電顕JSM5400（日本電子、東京）にて観察した。

3. 血管造影剤及び血管鑄型剤の注入時の骨内圧

微小血管造影法および血管鑄型法において得られた所見が、過剰な注入圧によるものではないことを証明するため、造影剤および鑄型剤の注入時の骨幹部における骨内圧を測定した。造影剤および鑄型剤の各々に対し、C群の5羽ずつの家兔を使用した。

前述と同様の静脈麻酔下に、家兔の大腿中央部に約2cmの縦切開を加え、筋間を鈍的に分けて骨幹部に到達した。ここに直径1.5mmのドリルで穴をあけ、16G静脈留置針の外筒を刺入し、留置針と骨との間にノベクタンスプレー液（吉富製薬、大阪）を噴霧して密着させた。留置針内は、ヘパリン加乳酸リンゲル液（乳酸リンゲル液100mlに対してヘパリン1000単位）で満たし、これを圧トランスデューサーCarrier Amplifier AP601G（日本光電、東京）および記録装置U-228-2P（ユニークメディカル、東京）に接続した。前述の通りに灌流および造影剤、鑄型剤の注入を行い、注入時の骨内圧を測定した。得られた値は $\bar{x} \pm SD$ で表した。

4. 凍結切断法を用いた走査電顕による観察、および類洞の断面積測定

A群、C群それぞれ5羽の家兔を使用した。試料の作成は、アルコール凍結切断法²³⁾を用いて以下のように行った。

前述と同様の麻酔および灌流を行った後、2.5%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.4）溶液を用いて灌流固定を行った。直ちに大腿骨を摘出し、骨髓を圧迫損傷しないように細心の注意を払いながら骨皮質を丁寧に除去して骨髓を摘出した。これをカミソリで約2mm角に切り出し、さらに同一溶液に24時間浸し、その後1%オスミウム酸-0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.4）溶液にて6時間の後固定を行った。50%から100%の希釈系列のアルコールで脱水した後、金属皿に試料を載せ、これを液体窒素に浮かべて急速凍結し、液体窒素であらかじめ冷却したカミソリで切断した。この切断した試料を酢酸イソアミルで置換した後、Critical Point Dryer HCP-AUTO（日立、東京）にて臨界点乾燥を行い、切断面を上にして試料台に載せた。これをION COATER IB-3（Eiko engineering, 茨城）を用いて金蒸着し、走査電顕JSM5400（日本電子、東京）にて観察した。

さらに、撮影した走査電顕写真をパーソナルコンピュータ（Power Macintosh 8100/80, Apple Computer, Inc., California, USA）に取り込み、画像解析用のパブリックドメインソフトNIHイメージ（U.S. National Institutes of HealthのWayne Rasband作）を用い、A群、C群から無作為に選択した類洞の断面積を20ヶ所ずつ測定した。方法は、コンピュータ上で類洞の切断面の外縁をトレースしてこの部分の面積を測定し、これを5回繰り返した平均を各々の断面積の値とした。得られた値は $\bar{x} \pm SD$ で表し、有意差の検定にはMann-WhitneyのU検定を用いた。

5. 逆行性静脈造影

A群、C群それぞれ5羽の家兔を使用し、微小血管造影法と同様の造影剤を用いた。前述と同様の麻酔および灌流を行った後、あらかじめ右大腿静脈に刺入しておいた19G静脈留置針から、

造影剤を手圧にて逆行性に注入した。約10時間常温で放置して造影剤を硬化させた後に大腿骨を摘出し、大腿骨に付着する筋肉などの軟部組織および骨膜を完全に除去した。この大腿骨を10%ホルマリンに浸漬して固定し、プランクリュクロ液で脱灰の後、軟X線撮影を行った。

成 績

I. 微小血管造影

軟X線撮影では、C群 (8週間ステロイド投与群) でも大腿骨全体が造影されており、動脈性の阻血を示唆するような明らかな無血管領域はみられなかった (図1)。

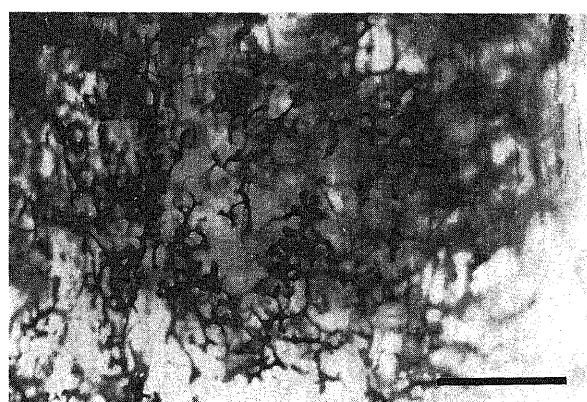
実体顕微鏡による透明標本の観察では、A群 (対照群、ステロイド非投与群) において、網目状の構造を呈する類洞が認められた (図2A)。これに対してB群 (4週間ステロイド投与群) の類洞は、A群の類洞に比して網目状構造が不明瞭となり、拡張している部分が認められた (図2B)。さらにC群では、このような変化が一層著明なものとなっていた (図2C)。以上のような変化は、程度の差はあるものの、B群、C群の全例において認められた。

II. 血管鋳型法を用いた走査電顕による観察

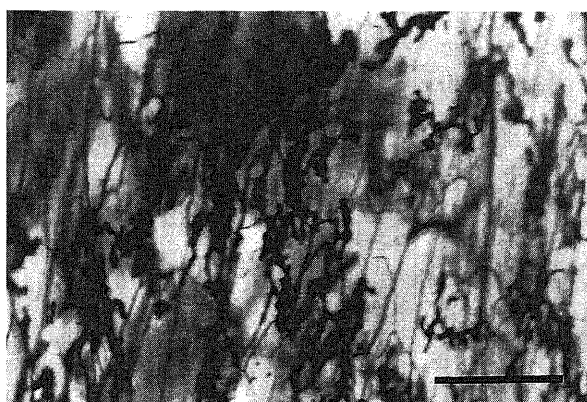
A群の類洞の径は10~20 μ m程度で比較的均一な形態を呈しており、その網目状の構造が三次元的に極めて明瞭に認められた (図3)。これに対してC群では、類洞が著明に、かつ極めて不均一に膨隆していた (図4)。類洞の長径が50 μ m以上に大きく膨隆し網目状構造が全く不明瞭になるものから、類洞は膨隆しているものの網目状構造は認め得るものまで、程度の差はあるが、C群全例にこのような形態的变化を認めた。また、B群の類洞は、網目状構造は認め得るもののA群に比して明らかに不明瞭で、かつ膨隆しており、C群に至る前段階のような変化を認めた (図5)。このような変化はA群の類洞にはみられなかった。

一方、直径20~70 μ m程度の細動脈には、A群とC群との間に著明な違いはみられなかった (図6, 7)。

微小血管造影法および血管鋳型法を用いた実験において認め



A



B



C

Fig. 2. Microangiograms of bone marrow sinusoids viewed with a dissecting microscope. Specimens have been cleared using the Spalteholz method. (A) Group A (control group). (B) Group B (4 weeks steroid-treated group). (C) Group C (8 weeks steroid-treated group). An anastomosing network of marrow sinusoids is seen in group A. In group B, the network is indistinct, and dilation of marrow sinusoids is evident. Changes are more prominent in group C. Bars indicate 500 μ m.



A

B

Fig. 1. Microangiograms of the femur. (A) Group A (control group). (B) Group C (8 weeks steroid-treated group). The steroid-treated group shows complete filling similar to that in the control group. No significant avascular areas suggestive of arterial ischemia are seen.

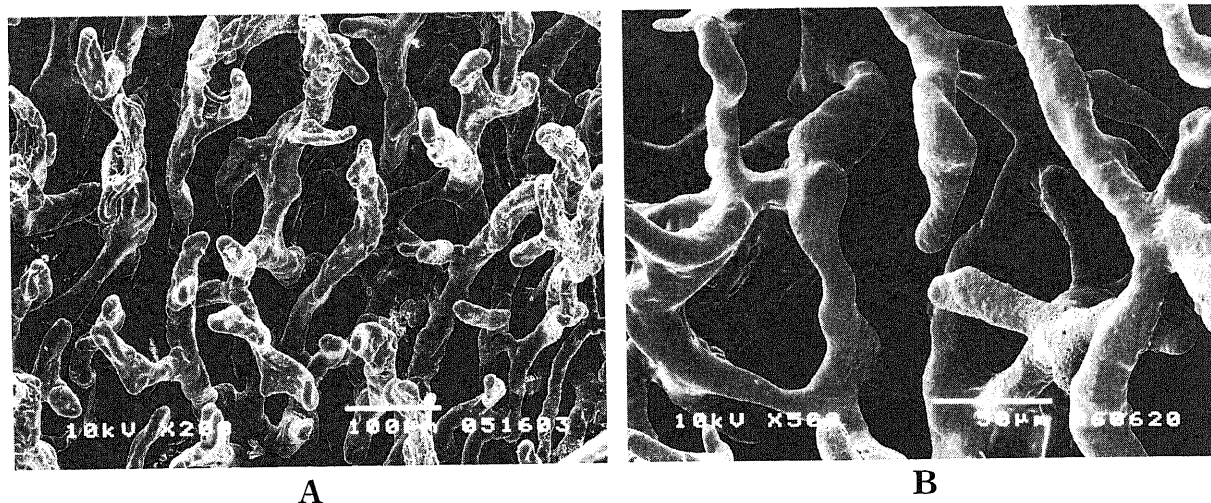


Fig. 3. Scanning electron micrographs of corrosion casts of bone marrow sinusoids in group A (control group). Marrow sinusoids ranging in diameter from 10 to 20 μm form a continuous anastomosing network and are comparatively uniform in contour. Original magnification: (A) $\times 200$, (B) $\times 500$.

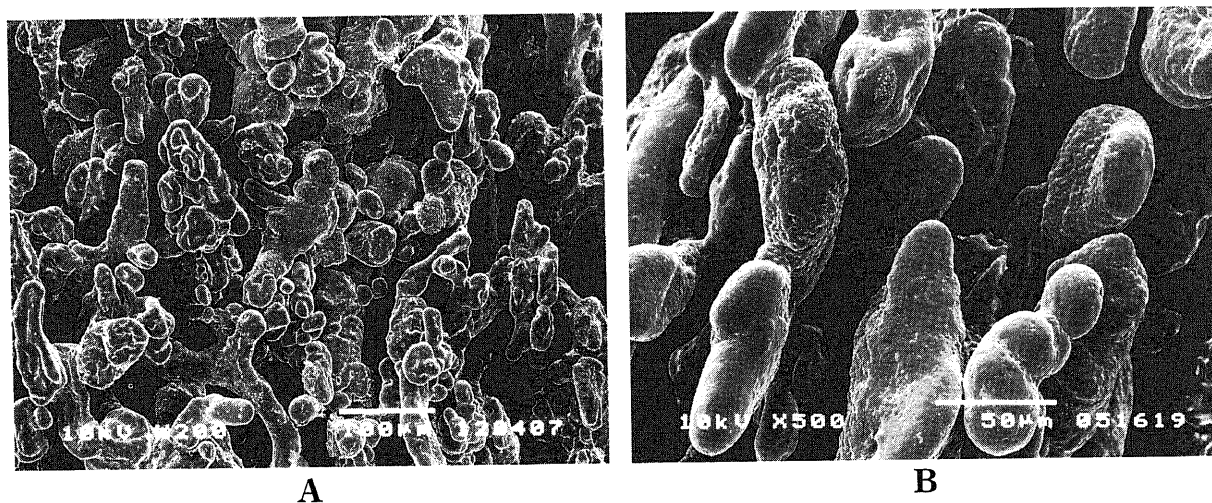


Fig. 4. Scanning electron micrographs of corrosion casts of bone marrow sinusoids in group C (8 weeks steroid-treated group). Sinusoids are bulged and the anastomosing network is indistinct. Sinusoids show marked variation in shape, with a maximum diameter exceeding 50 μm . Original magnification: (A) $\times 200$, (B) $\times 500$.

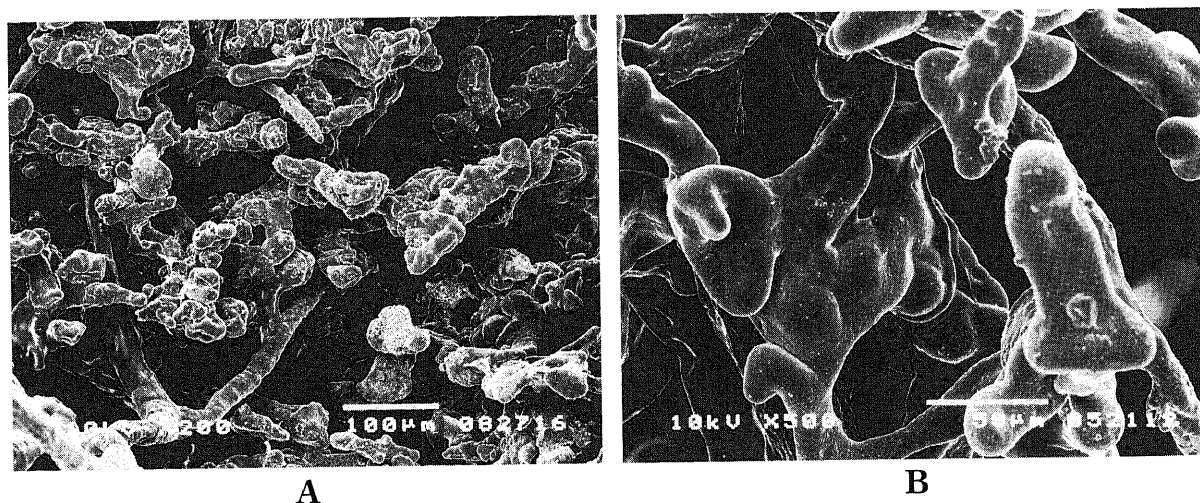


Fig. 5. Scanning electron micrographs of corrosion casts of bone marrow sinusoids in group B (4 weeks steroid-treated group). Sinusoids are bulged but the anastomosing network is partly recognizable. These findings are intermediate between group A (control group) and group C (8 weeks steroid-treated group). Original magnification: (A) $\times 200$, (B) $\times 500$.

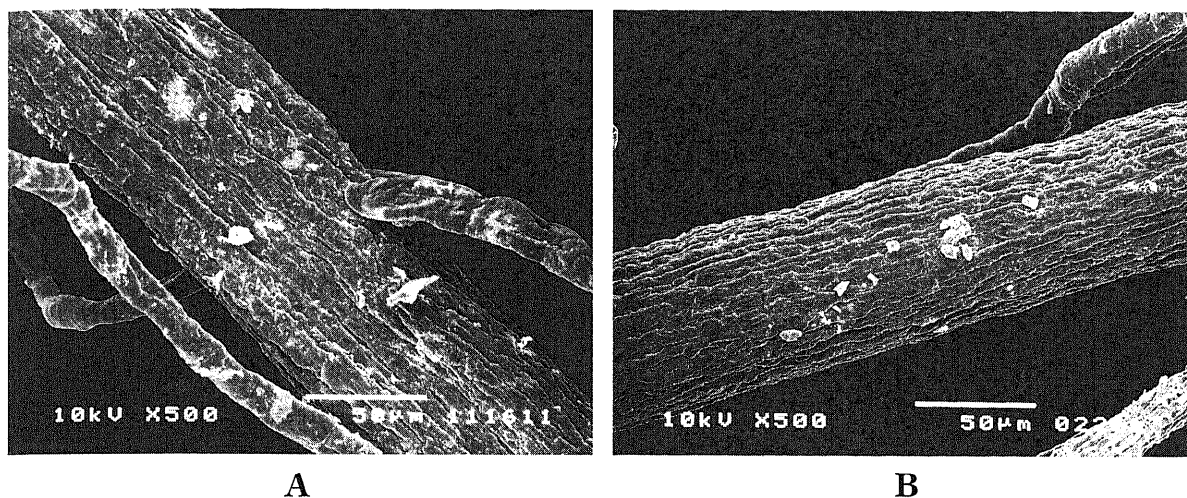


Fig. 6. Scanning electron micrographs of corrosion casts of intraosseous arterioles about 70 μm in diameter. (A) Group A (control group). (B) Group C (8 weeks steroid-treated group). No significant differences can be seen. Original magnification, $\times 500$.



Fig. 7. Scanning electron micrographs of corrosion casts of intraosseous arterioles about 20 μm in diameter. (A) Group A (control group). (B) Group C (8 weeks steroid-treated group). No significant differences can be seen. Original magnification, $\times 500$.

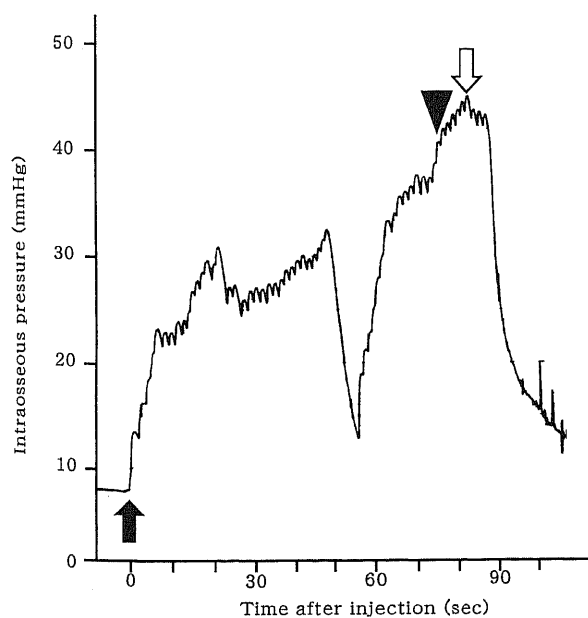


Fig. 8. Intraosseous pressure measurement on injection of casting medium in group C (8 weeks steroid-treated group). A black arrow, beginning of injection; an arrowhead, bolus of outflow; a white arrow, end of injection. The maximum intraosseous pressure occurred immediately after the bolus and decreased rapidly after injection.

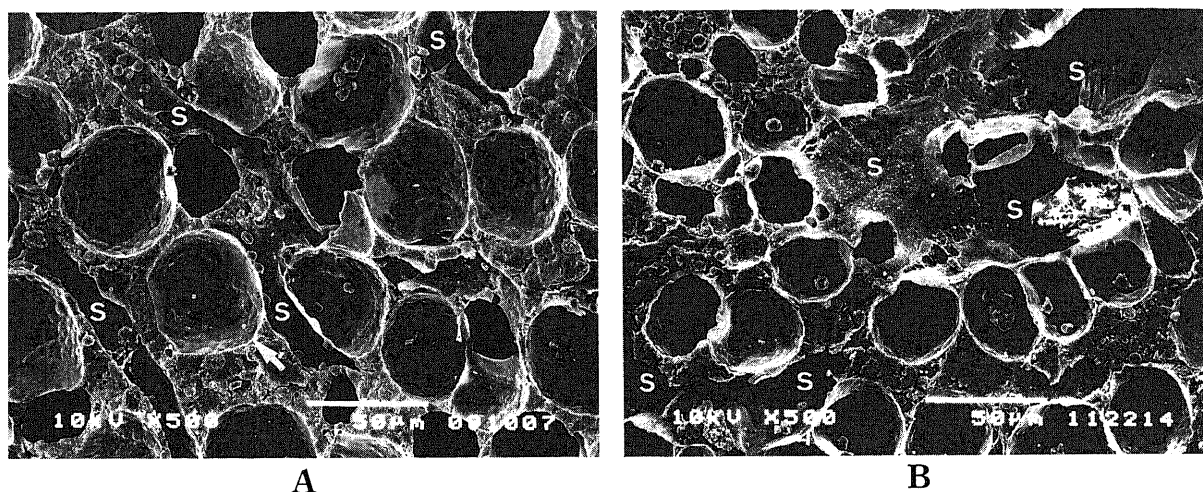


Fig. 9. Scanning electron micrographs of freeze-fractured surfaces of the bone marrow. (A) Group A (control group). (B) Group C (8 weeks steroid-treated group). S, sinusoid. Round saccular structures represent remnants of fat cells (arrow). Lipid contents have been lost in preparation. Marrow sinusoids in group C are dilated compared with group A, and are not indented by surrounding fat cells. Original magnification, $\times 500$.

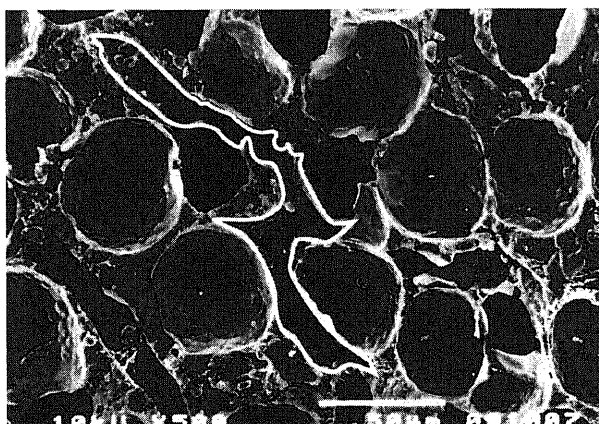


Fig.10. Method of measuring cross-sectional area of marrow sinusoids. White line in photograph indicates the outline of a cross-section; its area was measured by computer.

られた類洞の拡張ないしは膨隆状の変化は、動脈系の障害に起因する阻血によって生じたものではなく、骨内のうっ血状態を反映したものと考えた。

III. 血管造影剤及び血管鋳型剤の注入時の骨内圧

造影剤および鋳型剤の注入時の骨内圧は、各々の注入終了直前に流出部である下大静脈のクランプを行い、さらに数ml注入を追加したときに最大の値を示し、以後速やかに低下した (図8)。この時の最大骨内圧は、造影剤の注入時が $46.5 \pm 4.9 \text{ mmHg}$ 、鋳型剤の注入時が $39.2 \pm 5.6 \text{ mmHg}$ であった。同様の家兎モデルにおける骨内圧は $72.0 \pm 14.7 \text{ mmHg}$ と報告²⁴⁾されており、過剰な注入圧がかかっていないことが証明された。

IV. 凍結割断法を用いた走査電顕による観察、および類洞の断面積測定

割断面において、脂肪細胞は円形を呈し、試料作成に際して脂肪は脱落するため、内容は空虚であった。A群では、脂肪細胞の間に、短径が $10 \sim 20 \mu\text{m}$ 程度で細長い割断面を呈する類洞が認められた (図9A)。これに対してC群では、脂肪細胞はA群

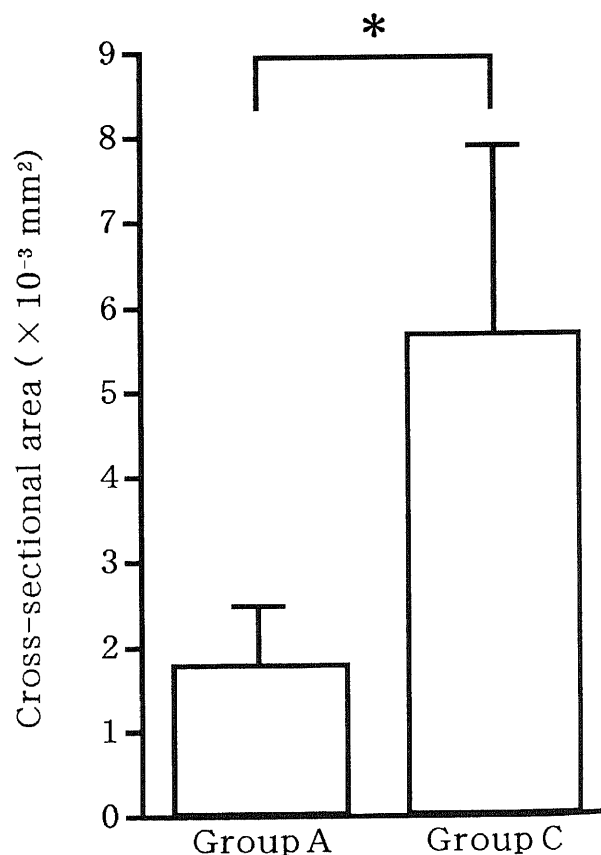


Fig.11. Cross-sectional areas of the marrow sinusoids. Values are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p < 0.001$.

と同様に円形の割断面を呈していたが、類洞は極めて不均一に拡張していた。この所見は、IならびにIIの実験で得られた所見を裏付けるものと考えられた。また、C群では、A群に比して脂肪髓化が生じていたが、類洞が周囲の脂肪細胞によって圧迫されているような所見はみられなかった (図9B)。

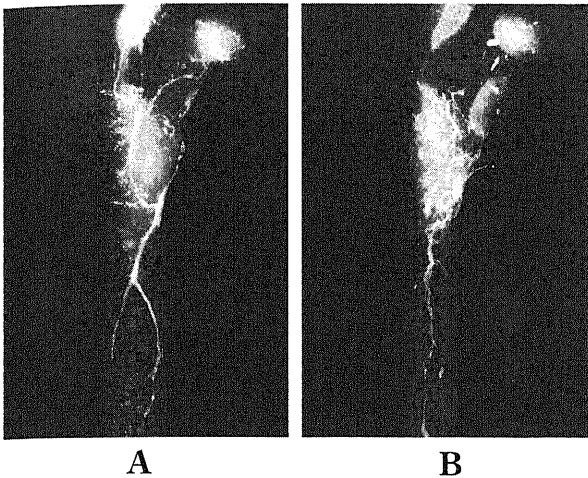


Fig.12. Retrograde venograms of the femur. (A) Group A (control group). (B) Group C (8 weeks steroid-treated group). The course of the inferior central vein in group C is attenuated compared with group A.

類洞の断面積測定 (図10)では、A群が $(1.81 \pm 0.64) \times 10^{-3} \text{mm}^2$ 、C群が $(5.70 \pm 2.39) \times 10^{-3} \text{mm}^2$ であり、C群において有意に断面積が増加していた ($p < 0.001$) (図11)。

V. 逆行性静脈造影

逆行性注入であるため、明らかに造影不良であった標本は除外した。A群、C群それぞれ3羽の家兔を検討に用いることができた。A群の大腿骨内中心静脈は、上方および下方からの静脈が吻合し、小転子下部から骨外へ流出していた (図12A)。これに対しC群の中心静脈には、A群と同様の造影像を呈するものはなかった。3例とも上方からの静脈が明瞭に造影されず、下方からの静脈も全体的に狭小化していた (図12B)。この所見は、中心静脈において還流障害が生じていることを示唆するものと考えた。

考 察

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序には諸説があり未だ不明な点が多いが、本症が最終的には骨頭内に虚血が生じて発生するという点では意見が一致している。本邦では1974年に厚生省の特定疾患に指定され、その調査研究班が中心となって研究が進められているが、これまで大腿骨頭内外の動脈系の変化が原因視されてきた。杉岡⁹⁾は摘出壊死骨頭の組織学的検討で、骨頭外の被膜下動脈に病変を認めたと報告し、Atsumiら¹⁾は、早期大腿骨頭壊死症例の選択的動脈造影を行い、上被膜動脈が大腿骨頸部被膜を通る部分で血行障害を認めたと報告している。また、Ohzonoら⁵⁾は、摘出壊死骨頭の微小血管造影を行い、骨頭内動脈の多発性の血管壁障害が循環障害をもたらすと報告している。しかしながら、これらの所見が一次性的の病変であるとは証明されておらず、骨頭壊死発生後に生じた二次性的の変化である可能性が否定できない。一方、欧米では、脂肪塞栓説⁶⁻¹⁰⁾やコンパートメント説^{10,11)}が提唱されてきた。脂肪塞栓説は、ステロイド投与による脂肪肝に由来する脂肪滴が骨頭内外の血管に脂肪塞栓を生じるとする説であるが、正常骨頭や通常の関節症の骨頭にも同様の脂肪塞栓が認められる^{25,26)}こと、他の塞栓症が生じないことなどの矛盾点がある。Saitoら²⁷⁾は、無症状

期の骨頭生検術の結果から、阻血が血栓や脂肪塞栓によって生じたと考えられる証拠はなかったと報告している。コンパートメント説は、大腿骨頭をひとつのコンパートメントと考え、骨頭内の脂肪細胞増大に伴って骨頭の内圧が上昇し、血管が圧迫されて血流低下を来たとする説であるが、松本ら²⁴⁾は、大腿骨全体の内圧測定の結果から、骨頭にはコンパートメントは存在しないと報告している。また、Zizicら^{28,29)}は、動脈系の阻血、骨内静脈系の流出障害および骨内血管外組織の障害という主に3つの要因を挙げ、これらが悪循環を形成して壊死をもたらすと述べているが、どの因子が初期変化であるのかは言及していない。また実験的な証明はなく推論の域を出ていない。

これらの説に対して松本ら¹²⁾、西村¹³⁾は、ステロイド投与家兔の大腿骨頭において、血流量が低下する一方で骨内圧が上昇していたことから、大腿骨頭壊死発生の前段階では、動脈系障害に先行して静脈系障害が生じて骨内にうっ血が起こり、これが壊死発生の重要な環境因子になっていると報告した。なぜなら、阻血が先行して血流が低下すれば、骨内圧は減少するはずだからである。さらに松本ら¹⁴⁾は、ステロイドを投与された臨床例の大腿骨頭においても同様の結果が得られたと報告している。その後、居石ら¹⁵⁻¹⁷⁾は、ステロイド投与歴のある無症候性大腿骨頭壊死症例の剖検において、骨頭周囲および骨頭内の動脈系に壊死を起こしうるとする異常は認められなかったが、骨頭周囲静脈に内膜の肥厚や高度の内腔狭窄が認められ、これによる還流障害が骨頭壊死発生の要因となった可能性があると報告した。また、Arnoldi³⁰⁾、Starklintら³¹⁾は、壊死の進行した骨頭を対象としたものであるが、その組織学的検討から、骨内の静脈障害が壊死発生の重要な病因であると推測している。さらに、従来ステロイド投与によって静脈に変化は生じない³²⁾とされてきたが、西村¹⁸⁾は、ステロイド投与家兔に対する免疫組織学的研究において、全身の静脈に病変が認められたと報告している。すなわち、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序として、近年では静脈系障害とそれに伴ううっ血が重要視されるようになってきているといえる。しかしながら、ステロイドが、類洞や中心静脈といった骨内静脈系に対して、壊死発生前にどのような変化をもたらしているのかを実験的に明らかにした報告はない。そこで本研究では、この骨内静脈系に焦点を当てた。

さて、骨髓における類洞は、一層の内皮細胞のみから成る極めて薄い構造であること^{33,34)}、動脈性毛細血管が類洞に流入すると内腔は著しく広がるため、類洞内の血流は極めて緩慢となり、なおかつ類洞内の場所によってかなり多様になることから、その構造は恒常的ではない^{34,35)}と考えられている。すなわち、阻血あるいはうっ血などの循環状態の変化に伴って類洞の形態や構築は変化すると考えられる。さらに、類洞は骨髓内の至るところに発達しており³⁶⁾、その変化を検討することは、骨内の循環状態を推察する上で極めて重要と考えられる。また、類洞を経た血液は中心静脈に集められて骨外へ流出する²²⁾ので、中心静脈の変化との関連を検討することも重要である。以上をふまえて本研究では、家兔にステロイドを投与し、それに伴う大腿骨内血管系の変化を、特に類洞から中心静脈に着目して観察した。

血管造影法においては、硫酸バリウムにゼラチンを混合した造影剤が頻用されているが、この造影剤は粒子の径が不均一であり、なおかつ径の大きい粒子も含まれるため、毛細血管のよ

うな細部の観察ができない。また、造影剤が塞栓を起こすとアーチファクトを生じ、これを異常所見として誤認する可能性がある。そこでまず、粒子の直径が $1\sim 2\mu\text{m}$ 以下と極めて微細でかつ均一であり¹⁹⁾、毛細血管までの造影が可能なマイクロフィルを使用して微小血管造影を行った。その結果、C群(8週間ステロイド投与群)においても明らかな無血管領域はなく、動脈性の阻血を示唆する所見はみられなかった。また、A群(対照群、ステロイド非投与群)には網目状の構造を呈する類洞が認められたが、B群(4週間ステロイド投与群)では類洞の拡張および網目状構造の不明瞭化が認められ、さらにC群ではこのような変化が一層著明なものとなっていた。

次いで、微細なレベルにおける形態的变化を明らかなものにするため、血管鋳型法を用いた走査電顕による観察を行った。本法はMurakami²¹⁾によって開発されたもので、毛細血管レベルの微小血管構築を明瞭かつ三次元的に観察することが可能である^{22)30)~32)}。その結果、C群の類洞の著明な、かつ極めて不均一な膨隆と網目状構造の不明瞭化という形態的变化が明らかとなり、B群では、C群に至る前段階のような変化が認められた。これに対し、直径 $20\sim 70\mu\text{m}$ 程度の細動脈には明らかな変化はみられなかった。

これらの成績から、類洞に拡張ないしは膨隆状の変化が生じていることが明らかとなり、この変化は動脈系の障害に起因する阻血によるものではなく、骨内のうっ血に伴って生じたものと考えた。

さらに、以上のような類洞の拡張ないしは膨隆状の変化という所見が、造影剤あるいは鋳型剤の過剰な注入圧によるものではないことを証明するため、C群を対象に、造影剤、鋳型剤の注入時の最大骨内圧を骨幹部で測定した。松本ら³⁴⁾は、同様のステロイド投与8週家兎の大腿骨骨幹部の骨内圧を $72.0\pm 14.7\text{mmHg}$ と報告しているが、今回の測定では、造影剤の注入時が $46.5\pm 4.9\text{mmHg}$ 、鋳型剤の注入時が $39.2\pm 5.6\text{mmHg}$ と明らかにそれ以下であり、得られた所見が過剰な注入圧によるものではないことが証明された。なお、血管鋳型法における鋳型剤の注入圧について井上ら⁴⁰⁾は、微細血管で 100mmHg の内圧ぐらいまでは耐えろし、骨組織に注入するには手動で力一杯圧しても破綻するようなことはないとして述べている。

さて、これらの方法は注入された人工物の像を観察したものであり、実際の類洞の形態を観察したものではない。しかし、組織切片を作成し光学顕微鏡で観察する方法では、類洞が極めて薄い壁構造であるため、その形態変化を論ずることは困難である。そこで凍結断面法による観察を行った。本法は断面の形態を明瞭に観察することが可能であり、Muto⁴¹⁾も、本法を骨髄の観察に利用している。その結果、C群の類洞は明らかに拡張し、断面積測定でも、C群において有意に断面積が増加していた。この所見は微小血管造影法および血管鋳型法で得られた所見と合致し、これらの成績を裏付けるものと考えられた。さらに、ステロイド投与に伴って骨髄の脂肪髄化が起こることが報告⁴²⁾されており、本法においてもこのような所見が認められたが、類洞が周囲の脂肪細胞によって圧迫されているような所見はみられなかった。

中心静脈の変化の観察には、逆行性静脈造影法を用いた。Fischerら⁴³⁾は、特定の血管走行を検討するためには造影剤を部分的に注入したほうが有利であると述べ、マイクロフィルを逆行性に注入することによって静脈系の観察を行っている。その

結果、A群の中心静脈は、Brookesら⁴⁴⁾の正常家兎における逆行性静脈造影の報告と同様であったが、これに対してC群の中心静脈は、全体的に狭小化しており、還流障害が生じていると考えられた。

以上の成績に基づいて、ステロイド投与に伴う大腿骨内の循環状態の変化について以下のように考察した。もし、ステロイド投与によって動脈系障害による阻血や脂肪塞栓が先行して生じるとすれば、血流量の減少によって類洞は縮小すると考えるのが妥当であるし、コンパートメント説で唱えられているように、脂肪細胞の増大に伴って骨内圧が上昇するのであれば、類洞は周囲から圧迫されているような所見が得られるはずである。しかし本研究で、ステロイド投与群において明らかに認められた所見は、類洞の拡張ないしは膨隆状の変化であった。さらに、ステロイド投与群に骨内の動脈系障害や脂肪細胞の増大による類洞の圧迫を示唆する所見はみられなかった。また、類洞の内圧については、東⁴⁵⁾が、骨内圧は静脈圧と密接な関係があると報告し、松本¹²⁾¹³⁾が、ステロイド投与によって骨内圧は上昇することを報告していることから、類洞の内圧は上昇していると考えられる。よって、このような類洞の変化は、阻血に起因するものではなく、類洞にうっ血が生じて内圧が上昇した状態を反映したものであると考えた。

このようなうっ血状態が生じる原因としては、類洞の内皮細胞に障害が生じること、ならびに中心静脈に還流障害が生じることが挙げられる。まず、類洞の内皮細胞障害についてであるが、島峰ら⁴⁶⁾は、放射線照射を受けた骨髄では、類洞の内皮細胞の細胞質の破壊によって類洞の拡張が認められると報告し、塩原ら⁴⁷⁾は、可溶性抗原抗体複合物を投与したモルモットの股関節の病理組織学的観察において、腫大した内皮細胞に囲まれた類洞の拡張を認めたと報告している。これらの報告は、類洞の内皮細胞が病的状態において変性すると、類洞の拡張が生じることを示唆している。また、ステロイド投与群における類洞の膨隆形態が著しく不均一であったことから、ステロイドが類洞の内皮細胞に何らかの直接的な障害を与えていると推測される。これらのことから、ステロイドは類洞の内皮細胞を障害し、このため類洞は拡張ないしは膨隆して網目状構造は不明瞭となり、類洞内の血流は一層緩徐で多様な乱流状態となって、うっ血状態を招く要因になっていると考えた。次いで中心静脈の障害についてであるが、類洞を経た血液が流入する中心静脈には還流障害を示唆する所見を得ている。西村¹⁸⁾は、ステロイド投与によって全身の静脈にも障害が起こり、還流障害をもたらすと報告しているが、同様の現象が骨内の中心静脈にも生じて静脈還流が障害され、うっ血状態をもたらす要因になっていると考えた。まとめると、ステロイド投与が骨内循環に引き起こす変化は、動脈系障害に基づく阻血ではなく、類洞から中心静脈にかけての静脈系障害によるうっ血であると結論づけられる。さらに、このうっ血状態はステロイド投与4週で既に生じていることも確認された。

家兎に対するステロイドの大量投与実験で骨頭壊死は発生しなかったと報告⁴⁸⁾されており、ステロイドがもたらす骨内のうっ血状態は、壊死を発生せしめるひとつの環境因子であると考えられる。しかし、ステロイドには、血液凝固能の亢進作用⁴⁹⁾⁵⁰⁾、抗血栓性の低下作用⁵¹⁾があることや、骨内に一旦生じた虚血状態からの血行回復力の低下作用が認められる¹⁹⁾ことが報告されている。これらに加えて、股関節は荷重関節であるという力学

的特性, 吻合に乏しいという大腿骨頭血管系の特殊性⁵²⁾⁵³⁾などの様々な要因が関与して, 最終的に骨頭は動脈性の虚血状態に陥り, 壊死発生に至るものと考えた。

本研究により, ステロイドは, 類洞から中心静脈にかけての骨内静脈系を障害して骨内にうっ血状態を引き起こしていることが明らかになった。このうっ血状態が, 骨内圧の上昇および血流量の低下をもたらして, 大腿骨頭壊死発生の重要な因子になっていると考えた。

結 論

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序を明らかにする目的で, 家兎を用い, ステロイド投与による大腿骨内血管系の変化について, 特に類洞から中心静脈に着目して観察し, 以下の結論を得た。

1. ステロイドを8週間投与した家兎において, 大腿骨内の類洞に拡張ないしは膨隆状の変化が認められ, 対照群に認められた網目状の構造が不明瞭となっていた。また, 類洞が周囲の脂肪細胞によって圧迫されているような所見はみられなかった。さらに, 骨内中心静脈は狭小化しており, 還流障害が生じていることが示唆された。

2. 類洞の膨隆状の変化および網目状構造の不明瞭化は, ステロイド投与4週で既に生じていた。

3. ステロイド投与家兎において, 動脈性の阻血を示唆するような明らかな無血管領域はなく, また, 直径20~70 μ m程度の細動脈に明らかな変化はみられなかった。

以上の成績から, ステロイドは, 類洞から中心静脈にかけての骨内静脈系を障害してうっ血状態を引き起こし, これによって骨内圧の上昇および血流量の低下をもたらして, 大腿骨頭壊死発生の重要な因子になっていると結論した。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚の謝意を捧げるとともに, 直接の御助言と多大なる御指導をいただきました松本忠美助教授に深謝いたします。

なお, 本論文の要旨は, ARCO 7th International Symposium on Bone Necrosis (Fukuoka, 1996), 厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班特定性大腿骨頭壊死症分科会平成8年度第2回分科会会議(東京, 1997), 第12回日本整形外科学会基礎学術集会(新潟, 1997)において発表した。本研究の一部は, 厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班特定性大腿骨頭壊死症分科会平成8年度研究費の援助を受けたことを付記し, 謝意を表します。

文 献

- 1) Pietrogrande V, Mastromarino R. Osteopatia da prolungato trattamento cortisonico. *Ortop Traum Appar Mot* 25: 791-810, 1957
- 2) 小野啓郎, 西塔 進. 大腿骨頭壊死症研究の進歩. *日整会誌* 61: 1323-1341, 1987
- 3) 杉岡洋一. 大腿骨頭特発性壊死の病態と治療. *日整会誌* 50: 1173-1192, 1976
- 4) Atsumi T, Kuroki Y. Role of impairment of blood supply of the femoral head in the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis. *Clin Orthop* 277: 22-30, 1992
- 5) Ohzono K, Takaoka K, Saito S, Saito M, Matsui M, Ono K. Intraosseous arterial architecture in nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. *Clin Orthop* 277: 79-88, 1992

6) Fisher DE, Bickel WH, Holley KE. Histologic demonstration of fat emboli in aseptic necrosis associated with hypercortisonism. *Mayo Clin Proc* 44: 252-259, 1969

7) Fisher DE. The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis. *Clin Orthop* 130: 68-80, 1978

8) Jones JP, Engleman EP, Steinbach HL, Murray WR, Rambo ON. Fat embolization as a possible mechanism producing avascular necrosis. *Arthritis Rheum* 8: 449, 1965

9) Jones JP. Fat embolism and osteonecrosis. *Orthop Clin North Am* 16: 595-633, 1985

10) Ficat RP. Idiopathic bone necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 67: 3-9, 1985

11) Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 59: 729-735, 1977

12) 松本忠美, 西村一志, 川北 哲, 勝木保夫, 西野 暢, 富田勝郎. 大腿骨頭血流および骨内圧に対するステロイドの影響. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班, 平成2年度研究報告書, 53-56頁, 1991

13) 西村一志. ステロイド投与家兎における大腿骨頭内血液循環に関する研究. *十全医会誌* 101: 817-826, 1992

14) 松本忠美, 勝木保夫, 西野 暢, 中村琢哉, 柳瀬茂樹, 武田秀之. ステロイド投与下における大腿骨頭内圧. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班, 平成3年度研究報告書, 87-89頁, 1992

15) 居石克夫, 平野 薫, 筒井秀樹, 杉岡洋一. SLEに合併した超早期大腿骨頭壊死の1例—病理組織学的検索を中心に—. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班, 平成2年度研究報告書, 79-85頁, 1991

16) 居石克夫, 平野 薫, 筒井秀樹, 杉岡洋一. 剖検時採取大腿骨頭の病理組織学的研究—骨頭栄養血管(静脈系)の検索—. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班, 平成2年度研究報告書, 93-97頁, 1991

17) 居石克夫, 平野 薫, 筒井秀樹, 杉岡洋一. 特発性大腿骨頭壊死症の臨床病理学的研究. *整・災外* 36: 3-12, 1993

18) 西村立也. ステロイド投与家兎における静脈病変—ステロイド性大腿骨頭壊死症の病因病態に注目して—. *十全医会誌* 104: 121-131, 1995

19) Lopez-Curto JA, Bassingthwaite JB, Kelly PJ. Anatomy of the microvasculature of the tibial diaphysis of the adult dog. *J Bone Joint Surg Am* 62: 1362-1369, 1980

20) 吉田雅之. 大腿骨頭の虚血性壊死と修復形態に関する脈管学的病理組織学的研究. *日整会誌* 65: 56-69, 1991

21) Murakami T. Application of scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch Histol Jpn* 32: 445-454, 1971

22) Ohtani O, Gannon B, Ohtsuka A, Murakami T. The microvasculature of bone and especially of bone marrow as studied by scanning electron microscopy of vascular cast - A review. *Scanning Electron Microsc I*: 427-434, 1982

23) 島田達生. 走査電子顕微鏡の試料作製法. よくわかる電子顕微鏡技術(医学・生物学電子顕微鏡技術研究会編), 初版,

99-119頁, 朝倉書店, 東京, 1992

24) 松本忠美, 藤井秀人, 西野 暢, 堀井健志. ステロイド投与家兎における大腿骨栄養動静脈の変化 (第2報). 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班, 平成7年度研究報告書, 77-79頁, 1996

25) Solomon L. Drug-induced arthropathy and necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 55: 246-261, 1973

26) Glimcher MJ, Kenzora JE. The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implications. *Clin Orthop* 140: 273-312, 1979

27) Saito S, Inoue A, Ono K. Intramedullary haemorrhage as a possible cause of avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 69: 346-351, 1987

28) Zizic TM, Marcoux C, Hungerford DS, Stevens MB. The early diagnosis of ischemic necrosis of bone. *Arthritis Rheum* 29: 1177-1186, 1986

29) Zizic TM, Lewis CG, Marcoux C, Hungerford DS. The predictive value of hemodynamic studies in preclinical ischemic necrosis of bone. *J Rheumatol* 16: 1559-1564, 1989

30) Arnordi CC. Vascular aspects of degenerative joint disorders. *Acta Orthop Scand Suppl* 261: 1-82, 1994

31) Starklint H, Lausten GS, Arnordi CC. Microvascular obstruction in avascular necrosis. *Acta Orthop Scand* 66: 9-12, 1995

32) Lorenzen I, Hansen LK. Effect of glucocorticoids on human vascular connective tissue. *Vasc Dis* 4: 335-341, 1967

33) 本陣良平. 造血器系と免疫系. 図説人体組織学 (本陣良平著), 第1版, 76-83頁, 南山堂, 東京, 1984

34) 島峰徹郎, 神山隆一. 骨髓の構造. 新版日本血液学全書2 造血臓器の構造と組織反応 (新版日本血液学全書刊行委員会編), 3-25頁, 丸善, 東京, 1990

35) 武石 詢. 骨髓の微小循環. 医学のあゆみ 57: 341-346, 1966

36) Irino S, Ono T, Watanabe K, Toyota K, Uno J, Takasugi N, Murakami T. Scanning electron microscopic studies on microvascular architecture, sinus wall, and transmural passage of blood cells in the bone marrow by a new method of injection replica and non-coated specimens. *Scanning Electron Microsc I*: 267-274, 1975

37) Draenert K, Draenert Y. The vascular system of bone marrow. *Scanning Electron Microsc IV*: 113-122, 1980

38) He S, Xiu Z, Hansen ES, Bünger C. Microvascular

morphology of bone in arthrosis. *Acta Orthop Scand* 61: 195-200, 1990

39) Uchida K. Stereoscopic vascular architecture of the adult rat femoral head. *J Jpn Orthop Assoc* 66: 514-524, 1992

40) 井上 一, 小野勝之, 児玉俊夫. 整形外科領域における微細血管構築の研究. *整形外科基礎科学* 5: 189-194, 1978

41) Muto M. A scanning and transmission electron microscopic study on rat bone marrow sinuses and transmural migration of blood cells. *Arch Histol Jpn* 39: 51-66, 1976

42) 川井和夫, 玉木昭彦, 広畑和志. ステロイド投与家兎にみられた大腿骨頭骨細胞の脂肪壊死. *臨整外* 19: 292-300, 1984

43) Fischer EG, Lorenzo AV, Landis WJ, Welch K, Ofori-Kwakye SK, Dorval B, Hodgins KJ, Kerr CS. Vasculature to the germinal matrix in rabbit pups. *J Neurosurg* 64: 650-656, 1986

44) Brookes M, Harrison RG. The vascularization of the rabbit femur and tibiofibula. *J Anat* 91: 61-72, 1957

45) 東 博彦. 骨循環動態の研究 (第1報) 骨内圧に関する基礎的研究. *日整会誌* 37: 267-289, 1963

46) 島峰徹郎, 高浜素秀, 伊藤梅男, 足立山夫, 網川省三, 神山隆一, 三宅祥三, 小池盛雄. 急性放射線骨髄障害及び再生の初期. *日病会誌* 55 (補): 365-374, 1966

47) 塩原治男, 石井良章, 芦沢真臣, 泉田重雄, 山口寿夫, 竹内 広, 鳥湯親雄. 大腿骨骨頭無腐性壊死について—その発生の周辺—. *日整会誌* 47: 1123-1124, 1973

48) Gosling DC, Sampson WFD, MacLeod M, Hanby AM, Slapak M. Susceptibility of the rabbit and the rat to steroid osteonecrosis - An experimental study. *Transplantation* 43: 751-753, 1987

49) Cosgriff SW. Thromboembolic complications associated with ACTH and cortisone therapy. *JAMA* 147: 924-926, 1951

50) van Giezen JJJ, Jansen JWCM. Correlation of in vitro and in vivo decreased fibrinolytic activity caused by dexamethasone. *Ann N Y Acad Sci* 667: 199-201, 1992

51) De Caterina R, Weksler BB. Modulation of arachidonic acid metabolism in human endothelial cells by glucocorticoids. *Thromb Haemost* 55: 369-374, 1986

52) Trueta J, Harrison MHM. The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *J Bone Joint Surg Br* 35: 442-461, 1953

53) 山室隆夫. 股関節の血管系の解剖とその發育. 股関節外科学 (伊藤鉄夫編), 第3版, 39-59頁, 金芳堂, 京都, 1987

Effects of Steroids on Intraosseous Femoral Vasculature in Rabbits Takeshi Horii, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640—J. Jusen Med Soc., **107**, 95—105 (1998)

Key words steroid, osteonecrosis, sinusoid, vein

Abstract

The etiology of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head is still unknown. Possible venous causes of stasis in bone circulation have attracted attention recently. To clarify the effects of steroids on intraosseous venous system, the present study was performed to examine steroid-induced changes in intraosseous femoral vasculature in rabbits, particularly bone marrow sinusoids and central veins. Mature rabbits were divided into three groups: group A, untreated controls; group B, which received four weekly intramuscular injections of methylprednisolone acetate (4 mg/kg); group C, which received injections for 8 weeks. Microangiography revealed an anastomosing network of marrow sinusoids in group A. The network was indistinct in group B, and marrow sinusoids were dilated. These changes were more prominent in group C, but no significant avascular areas suggesting arterial ischemia were present. Scanning electron micrography using a corrosion cast method clearly demonstrated that marrow sinusoids in group C were bulged and the anastomosing network was indistinct, with the group B appearing intermediate between the others. However, no differences from group A could be seen in arterioles 20 to 70 μm in group C. Scanning electron micrography using freeze-fracture method confirmed marrow sinusoids in group C to be significantly dilated. Furthermore, marrow sinusoids in group C were not indented by surrounding fat cells. The mean cross-sectional area of marrow sinusoids was $1.81 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ in group A and $5.70 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ in group C, a significant difference. In retrograde venography, the course of the central vein in group C was attenuated compared to the course in group A which could suggest a disturbance of the venous drainage. These findings indicated that steroids did not induce arterial ischemia but did produce intraosseous venous stasis extending from marrow sinusoids to central veins, resulting in dilation or bulging of marrow sinusoids, already evident after 4 weeks. This development increases intraosseous pressure and decreases blood flow, and this might be one of the important factors promoting osteonecrosis.